

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒 B、C 基因型全基因组序列的克隆*

赵建华, 陆仁飞[△]

(江苏省南通市第三人民医院检验科 226006)

摘要:目的 构建乙型肝炎病毒(HBV)B、C 基因型全基因组序列克隆。方法 从 HBV 无症状慢性携带者中筛选 B、C 基因型,提取病毒核酸,设计引物,应用高保真酶对 3 200 bp 的 HBV DNA 进行全序列扩增,通过克隆技术构建 pGEM-HBV 重组质粒,测序后进行序列分析。结果 获得 HBV B 基因型和 HBV C 基因型重组质粒各 1 株。结论 成功构建 HBV B 基因型和 HBV C 基因型的全基因组序列克隆,可为进一步研究 HBV 分子流行病学和基础研究提供工具。

关键词:乙型肝炎病毒; B 基因型; C 基因型; 全基因组序列; 克隆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)22-3101-04

Cloning of complete-genome sequence of hepatitis B virus genotype B and C*

ZHAO Jianhua, LU Renfei[△]

(Department of Clinical Laboratory, Nantong Municipal Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, Chian)

Abstract: Objective To construct the clone of full-genome sequence of hepatitis B virus (HBV) genotype B and C. **Methods** HBV genotype B and C were screened from asymptomatic carriers of HBV for extracting HBV nucleic acid and designing primer. The high fidelity enzyme was used to perform the full sequence amplification of 3 200 bp HBV DNA. The pGEM-HBV recombinant plasmid was constructed by using the clone technique. Then the sequence analysis was performed after sequencing. **Results** Each strain of recombinant HBV genotype B and C was obtained. **Conclusion** The clone of full-genome sequence of HBV genotype B and C is successfully constructed, which can provide a tool for further study of HBV molecular epidemiology and basic study.

Key words: HBV; genotype B; genotype C; complete genome sequence; clone

乙型肝炎病毒(HBV)是严重威胁人类健康的病原体,全球约有 20 亿人感染过 HBV,其中超 3.5 亿人发展为慢性感染者。我国是 HBV 感染流行的高发区^[1-2]。由于 HBV 在复制过程中缺乏校对酶作用,容易发生核苷酸配对错误,长期突变累积形成不同基因型。根据“HBV 全基因组序列大于 92%”的标准,可将 HBV 分为 A~H 8 种基因型^[3],HBV 基因型研究不仅与 HBV 的分子流行病学和基础医学研究密切相关,且与病毒感染后的临床进展相关^[4]。我国 HBV 基因型以 B、C 型为主^[1]。HBV DNA 是双链非闭合的松弛结构,正负 2 条链不等长,加之基因组长度为 3.2×10^3 ,使得 HBV 全基因组的扩增和克隆较难。本研究采用一步法长距离聚合酶链式反应(PCR)的方法获得完整的 3.2×10^3 HBV 全基因组,进一步构建 HBV 基因 B、C 型质粒,为后续的 HBV 研究提供工具。现报道如下。

1 资料和方法

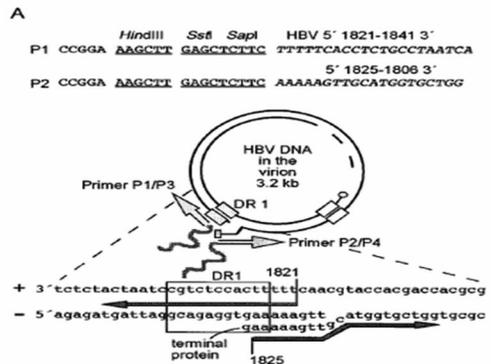
1.1 一般资料 30 例无症状 HBV 携带者,诊断符合 2000 年 9 月全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》标准^[5],患者未经任何 HBV 疫苗免疫和任何抗病毒药物治疗。HBV 血清标志物包括表面抗原(HBsAg)、表面抗体(抗 HBsAb)、e 抗原(HBeAg)、e 抗体(抗 HBeAb)、核心抗体(抗 HBcAb)。抽取患者血液,分离血清。

1.2 仪器与试剂 血清病毒核酸提取试剂盒由厦门至善生物公司提供;HBV DNA 定量试剂盒购于上海科华生物科技有限公司;HBV 基因分型试剂盒购于上海之江生物公司;E. Z. N. A gel extraction kit、E. Z. N. A plasmid mini kit 购于 Omega 公司;Kod-Plus 聚合酶购于 TOYOBO 公司;T-easy vector 购于 Promega 公司;DH-5 α 由南通大学病原生物学实验室惠赠;限

制性内切酶 Sal I、EcoR I 购于大连 TaKaRa 公司;PCR 扩增仪为 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪,凝胶成像系统为 SYNGBOX。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 核酸提取 吸取 100 μ L 血清,严格按照血清中病毒核酸提取试剂盒(手工法 100 μ L 体系)说明书操作,最后用 50 μ L 洗脱液洗脱。



注:F1 为 5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3';R1 为 5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'。

图 1 引物序列的设计

1.3.2 HBV DNA 定量检测及 HBV B、C 基因型筛选 HBV DNA 定量检测采用实时荧光定量 PCR 法,操作按说明书;HBV B、C 基因型检测采用 TaqMan 荧光探针 PCR 法,操作按说明书。

* 基金项目:江苏省南通市卫生和计划生育委员会资助项目(WQ2014038,W201217);江苏省南通市科技局资助项目(HS2014062)。

作者简介:赵建华,男,副主任技师,主要从事临床微生物方面的研究。 [△] 通讯作者,E-mail:rainman78@163.com。

1.3.3 引物 引物设计参考 Gunther 等^[6]的引物序列,以 HBV 负链开口处为克隆序列的起始点,引物由英骏生物上海合成部合成,见图 1。

1.3.4 HBV 的全基因组序列扩增 扩增所用高保真聚合酶 Kod-Plus 酶购自 TOYOBO 公司。PCR 扩增反应体系参照说明书。扩增循环参数为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 3.5 min,共 35 个循环。扩增产物加 A,加 A 反应条件为 72 °C ,30 min;加 A 产物胶回收。

1.3.5 HBV 全基因组序列的克隆及鉴定 胶回收产物与 pGEM-Teasy 载体 4 °C 连接 16 h;连接产物转化 DH-5 α 感受态细胞,挑取阳性菌落,抽提质粒,SAL I、ECOR I 酶切鉴定。

1.3.6 HBV 全基因组序列克隆质粒测序及分析 选择经酶切鉴定证实含 3 200 bp 片段的重组质粒送上海华大基因测序部测序,测序结果进行 Genbank 比对,DNASTAR 分析。

2 结 果

2.1 HBV B、C 基因型的筛选 以患者血清中提取的 HBV DNA 为模板,实时荧光定量 PCR 法测定病毒载量,见图 2;以提取的 HBV DNA 为模板,TaqMan 荧光探针 PCR 法筛选 HBV B、C 基因型,见图 3。

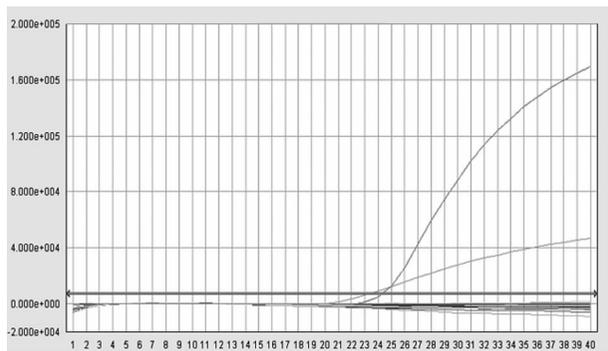


图 2 实时荧光定量 PCR 法测定病毒载量

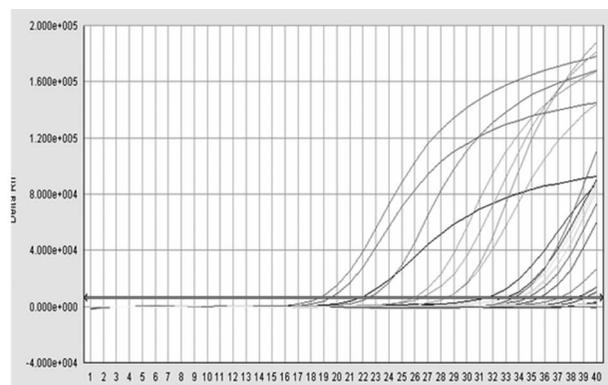
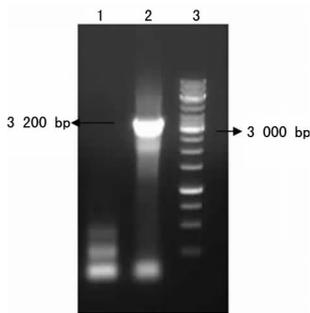


图 3 TaqMan 荧光探针 PCR 法筛选 HBV B、C 基因型

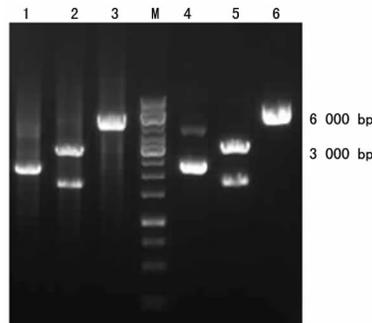


注:1 为阴性对照;2 为患者血清 HBV DNA 作模板的 PCR 产物;3 为 DNA Marker。

图 4 HBV 全长基因组的扩增

2.2 HBV DNA 的扩增 以筛选到的 HBV B、C 基因型的 HBV DNA 为模板,利用 F1 和 R12 条引物扩增 HBV 基因组,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,在约 3 200 bp 处有特异性扩增条带,见图 4。

2.3 构建质粒的酶切鉴定 为验证重组质粒中是否插入 3 200 bp 的目标序列,提取质粒后进行酶切鉴定。结果显示:在 pGEM-Teasy Vector 中插入了 3 200 bp 大小的片段,见图 5。



注:1,4 为 pGEM-HBV 质粒;2,5 为 ECOR I 单酶切;3,6 为 Sal I 单酶切;M 为 DNA Marker。

图 5 pGEM-HBV 质粒酶切鉴定图

Table of HBV-B2 sequence alignment. The table lists nucleotide positions from 1 to 3201 and provides the corresponding sequence for each position. The sequences are aligned in columns, showing variations between different samples or regions.

图 6 HBV-B2 序列

2.4 序列分析 测得序列,剔除载体序列,通过 Genbank 进行核苷酸比对,2 株 HBV 重组质粒的基因型为 B 型和 C 型,获得 2 个 HBV 全基因组序列长度分别为 3 215 bp 和 3 216 bp,能够完整翻译 HBV 所有蛋白,分别将其命名为 HBV-B2 和 HBV-C1,见图 6、7。通过 MEGA 4 软件对其基因进行分型,确定其为 B、C 基因型,见图 8(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

```

1 CTCCACAACA TTCACCAAG CTCGTCTAGA CCCCAAATG AGGGGCGCTAT
51 ACTTTCCTGC TGGTGGCTCC AGTCCGGAA CAGTAAACC TGTTCCGACT
101 ACTGCCTCAC CCATATCGTC AATCTTCTCG AGGACTGGG ACCCTGCACC
151 GAACATGGAG AACACAGCAT CAGGATTCCT AGAACCCCTG CTCGTGTCTA
201 AGGCGGGGTT TTTCTTGTG ACAAGAATCC TCACAATACC ACAGAGTCTA
251 GAGCTCGTGT GGACTTCTCT CAATTTCTA GGGGGAGCAC CCACGTGTCC
301 TGCCCAAAAT TGCGACTGCC CAACCTCCAA TCACTCAACC ACCTCTGTGC
351 CTCOAATTTG TCTCGGTAT CGCTGGATGT GTCTCGGGCC TTTTATCATTA
401 TTCTCTTCA TCCCTGCTGT ATGCTCTCAGT TCTTGTGTG TTTCTCTGGA
451 TTACCAAGGT ATGTTGCCCG TTTGTCTCT ACTTCCAGGA ACATCAACTA
501 CCAGCAAGGG ACCATGCAAG ACCTGCACGA TTCCTGCTCA AGGAACTCTT
551 ATGTTTCCCT CTGTGTCTGT TACAAAACCT TCGGACGGAA ACTGCACCTT
601 TATTCOCAT CCATCATCTT GGGCTTTGCG AAGATTCTTA TGGGAGTGGG
651 CCTCAGTCCG TTTCTCTGT CFCAGTTCAC TAGTGTGAAC TGTTCACTGG
701 TTCTGATGGC TTTCCCCAC TGTTTGGCT TCACTTATAT GGATGATGTG
751 TGATTTGGGG CCAAGTCTGT ACAACATCTT GAGTCCCTTT TTACCTTAT
801 TACCAATTTT CTTTGTCTT TGGGTATACA TTTGAACCTT AATAAAACCT
851 AACGTTGGGG TTACTCCCTT AACTTTCATG GATATGTAAT TGGAAATGGG
901 GGTACTTTC ACACAAGTAA TATGTACTA AAATCGAAG AATGTTTTCG
951 AAAACTGCCT GTAATAGAC CTAATGATG GAAAGTATGT CAGAGAATGG
1 001 TGGGCTTTT GGGCTTGTCT GGGCTTTTGA CACAATGTGG CTACTCTGCC
1 051 TTAATGCCAT TATATGCATG TATACAATCT AAGCAGGCTT TCATCTTCTC
1 101 GCCAAGTCTT AAGGCTTTC TGTGTAAACA ATATCTGAAC CTTTACCCCG
1 151 TTGCCCGGCA ACGGTGAGGT CTCGTGCAAG TGTTCCTGTA CGCAACCCCC
1 201 ACTGTGATGG GCTTGTCTGT TGGCCATCCG TCGATGCCGT TGTTCACTGG
1 251 GGTCTCTCTG CCGATCCATA CFCGGAACT CCTAGCAGCT TGTTTGCTC
1 301 CGCCAGGATC TGGAGCGAAA CTTATCGGAA CCGACAACCT TGTTTGCTC
1 351 TCTCGGAAAT ACACCTCATY TACTGGGCTG CTAGGTTGTG TCGCAACTGT
1 401 GATCCTCGCC GGGAGCTCCT TTGTCTACGT CCGTCTGGCC CTGAATCCAG
1 451 CGGACGAGCC GTCTCGGGCC GCTTGGGGCT CCGTCTGCC CTACTCTCAT
1 501 CTGCCGTGCC GGGCCAGCAC GGGGGCGAAT TCTCTTACG CGGTCTCCCC
1 551 CTCTGTGCTT TCTCATCTGC CGGACCGTGT TCGTCTCGCT TACTCTTGC
1 601 ACGTGCAGAT GAGACCCAGC TGAACGCCCA CCGAGTCTTG CCCAAGGTTT
1 651 TACATAAGAG GACTCTTGGG ACTCTCAGCA TGTCAACGAC CGACTTGTAG
1 701 CGCTACTTCA AAGACTGTTT GTTAAAGGAC TGGGAGGAT TGGGGGAGGA
1 751 GATTAGGTTA AAGACTGTTT TACTAGGAGC CTGTAGCCAT AAATGGTCT
1 801 GTCTACCCAG ACCATGCTTC TTTTCACTCT GCTGCTAATC ATCTCTTGT
1 851 CATGCTCTAC TGTCAAGCC TCCAAGTCTT GCCTTGGGTG GCTTGGGGG
1 901 ATGGACATTT ACACGTATAA AAGAATTTGA GCTTCTGGGG AGTACTCTCT
1 951 TTTTGTGCTT TCTGACTTCT TTCTTCCAT TCGAGATCTC CTGACACCCG
2 001 CCTCTGCTCT GTATCGGGTG GCGTTAGAGT CCGGGAACA TTTGTTCACTT
2 051 CACCATACAG CACTCAGGCA AGCTATTCTT TGTGTGGATG AGTGTGATAA
2 101 CTCTGCCACC TGGTGGGAAA GTAATTTGGA AGACCTTGCA TCCAGGGAAT
2 151 TAGTAGTCCG CTATGTCAAT GTTAAATATG GCCTAAAAC TACAGCAACTA
2 201 CTGTGGTTC ACATTTCTGT TCTTACTTIT GGAAGAGAAA CTTGTTCTGA
2 251 ATATTTGGTG TCTTTTGGAG TGTGGATTTG CCGACTCTCT GCTTACAGAC
2 301 CACAAAATGC CCTATCTTA TCAACACTCT CCGAAACTAC TGTTGTAGA
2 351 CAGCAGAGGCA GGTCCCTAG AAGAAGAACT CCTCGCCTC GCAGACGAAG
2 401 GTCTCAATCC GCGGTGCGCA GAAGATCTCA ATCTCGGGAA TCTCAATGTT
2 451 AGTATCCCTT GGACTCATAA GGTGGGAAAC TTTACTGGGC TTTATCTTTC
2 501 TACTGTACTT GCTTAAATCT CTGAGTGGCA AACTCCCTCC TTTCTCACA
2 551 TCTTATTTACA GGAGGACAT TTAATAGAT TCAACAATA TGTGGGGCTG
2 601 CTTACAGTTA ATGAAAAAG GAGATTAATA TTAATATGC TCTGATGGTT
2 651 CTATCTAAC CTATACAAAT ATTTGCCCTT GGACAAAGGC ATTAACCCCT
2 701 ATATCTCTGA ACATACAGTT AATCATACT TCAAAACTAG GCATTTATTA
2 751 CATACTCTGT GGAAGGCTGG CATCTATAT AAGAGAGAAA CTACAGCCAG
2 801 CGGCTCATT TGTGGTCCAC CATATCTTG GGAACAAGAG CTACAGCCAG
2 851 GGAGTGTGGT CTTCCAAACC TCGACAAGGC ATGGGGCAA ATCTTCTGT
2 901 TCCCAATCCT CTGGGATCTT TTCCGATCA CCGATTGGAC CCGGGTTCG
2 951 GAGCAACTC AAACAATCCA GATTTGGGAT TCAACCCCAA CAAGGATCAT
3 001 TGGCCAGAGG CAATCAGGT AGGAGCGGGA GCATTCCGGC CAGGCTCTAC
3 051 CCCACCACAC GGGGCTTTT TGGGGTGGAG CCTCAGGCT CAGGCTATAT
3 101 TGAAACAGT GCCAGTAGCA CTTCTCTCTG CCTCCACCAA TCGGCAGTCA
3 151 GGAAGACAGC CTACTCCCAT CTCTCCACT CTAAGAGACA GTCATCTCTA
3 201 GGCCATGAGC TGGAA
    
```

图 7 HBV-C1 序列

3 讨 论

本研究对象选取未接受任何 HBV 疫苗免疫和任何抗病毒药物治疗的无症状携带者。我国 HBsAg 的流行率大约为 10%,其中大部分是无症状携带者^[1-7]。由于未经过、未接受任何 HBV 疫苗免疫和任何抗病毒药物治疗,宿主中 HBV 毒株受到的免疫压力和药物筛选作用小,在感染过程中病毒变异发生率低,能确实反映我国 HBV 流行株存在情况,具有更广的代表性,其构建的 HBV 全基因组克隆可为 HBV 相关研究提供有利条件。

HBV 基因型分布有较显著的地域特征,A、D 型主要分布在欧洲和美国,B、C 型主要分布在东南亚和东亚,E 型主要在西非流行,F 型集中在中南美洲,而 G 型仅在个别国家有单个

案例报道^[7-8]。我国以 B、C 基因型为主,本试验构建的 HBV B、C 基因型全基因组序列克隆顺应了我国 HBV 研究的需要。

然而,在对 30 个无症状携带者筛选 B、C 基因型过程中,笔者发现,只有 1 例患者是 B 基因型,其余 29 例均为 C 基因型,与以往文献报道 B、C 基因型比例相差较大^[8-11]。此可能与样本量太小无统计学意义,采用 TaqMan 荧光探针法没有测序法精确,大规模疫苗接种和临床抗病毒药物的广泛使用造成 B、C 基因型比例改变等相关,具体原因有待下一步试验研究证实。

以往研究中,扩增 HBV 全基因组根据所使用引物数目的不同,可以分为一段法(使用 1 对引物)和多片段法(使用多对引物)。由于 HBV 突变率相对较高,同一患者体内的 HBV DNA 序列是以 1 个准种池的形式呈现^[12-15],而非单一序列,本试验采用了一种步长距离 PCR 扩增 HBV 全基因组序列,避免了多次 PCR 拼接所导致的“人工假基因组”现象。

HBV DNA 是双链非闭合的松弛结构,正负 2 条链不等长,加之基因组长度为 3.2×10^3 ,使得 HBV 全基因组的扩增和克隆难度较高。因此,提取病毒 DNA 的效率及完整性、聚合酶的保真度和扩增效率将是试验成败的关键。笔者通过高温裂解法、柱提法、磁珠提取法比较发现,高温裂解法虽然有较高提取效率但提取的核酸无法扩增全长(可能由于高温碱裂解打断了 DNA 链完整性);柱提法能将病毒载量大于 1×10^6 copy/mL 血清提取的核酸扩增到 3.2×10^3 的 HBV 全基因组,而从病毒载量小于 1×10^6 copy/mL 血清提取的核酸很难扩增到 3.2×10^3 的 HBV 全基因组;磁珠提取法能从病毒载量大于 1×10^5 copy/mL 血清提取的核酸扩增到 3.2×10^3 的 HBV 全基因组。因此,笔者推断磁珠法更适合低滴度长片段核酸的提取。普通的 Taq DNA 聚合酶有很强 5'→3'的聚合酶活性,但是缺乏 3'→5'核酸外切酶活性,无法消除扩增过程中与模板链错配的现象,本试验的 PCR 酶采用了 TOYOBO 公司的 Kod-Plus 酶,Kod-Plus 酶具有较高的 DNA 合成效率以及 PCR 保真度,其保真度大约为普通 Taq DNA 聚合酶的 82 倍^[11],但是,Kod-Plus 具有较强的 3'→5'核酸外切酶活性,使其扩增的 PCR 产物末端被平滑化,故不能直接进行 TA 克隆。为便于 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接,必须在 PCR 后,对 PCR 产物末端进行加 A 反应,增加 TA 克隆效率。

参考文献

[1] Andrey B, Berezin V, Prilipov A, et al. Phylogenetic analysis of the non-structural(NS) gene of influenza A viruses isolated in kazakhstan in 2002-2009[J]. Virol Sin, 2011 (6): 26-36.

[2] Tangkijvanich P, Sa-Nguanmoo P, Avihingsanon A, et al. Characterization of hepatitis B virus mutations in untreated patients co-infected with HIV and HBV based on complete genome sequencing[J]. J Med Virol, 2013, 85(1): 16-25.

[3] Jing Y, Bo PZ, Yasuhito T. Hepatitis B virus(HBV) genotypes/subgenotypes in China: mutations in core promoter and their clinical implications[J]. J Clin Virol, 2007, 39: 87-93.

[4] Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouveia MS, et al. Phylogenetic analysis of complete genome sequences of

hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: presence of HBV F3/A1 recombinant strain[J]. *J Virol*, 2012,9(1):244.

[5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.

[6] Gunther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. *J Virol*, 1995, 69(9):5437-5444.

[7] 张韧, 王敏, 符瑞佳, 等. HBV 基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(3):152-155.

[8] 吴若芬, 师志云, 贾伟, 等. 3 种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂检测结果比较[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(2):204-207.

[9] 任文娟, 贾淑芳, 孙慧, 等. 成都市 HBV 基因型分布特点及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(5):575-578.

[10] 李海波, 强福林, 杨自力, 等. 南通地区 B 型乙型肝炎病毒 PreS 基因参照序列的建立[J]. *现代预防医学*, 2009, 36(23):4498-4500.

[11] Odgerel Z, Choi IK, Byun KS, et al. Complete genome se-

quence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus (HBV) isolated from Mongolian patients with chronic HBV infection[J]. *Virus Genes*, 2006, 33(3):345-349.

[12] Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 1992, 66(7):4073-4084.

[13] Odgerel Z, Choi IK, Byun KS, et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus (HBV) isolated from Mongolian patients with chronic HBV infection[J]. *Virus Genes*, 2006, 33(3):345-349.

[14] Heipertz RA, Miller TG, Kelley CM, et al. In vitro study of the effects of precore and lamivudine-resistant mutations on hepatitis B virus replication[J]. *J Virol*, 2007, 81(7):3068-3076.

[15] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(4):1005-1009.

(收稿日期:2016-04-15 修回日期:2016-06-21)



(上接第 3100 页)

要求护士认真阅读, 护士长定期对科室护士进行标本采集知识的口头和技能考试。针对实验室信息系统进行系统升级, 完善其功能, 对标本条码进行改造, 增加采血量及采血容器的提示, 避免采血量的错误及用错采血容器; 改造标本流程, 要求护士采集标本后扫描采集时间, 标本转运人员运输标本时扫描运输时间, 完善标本流转的各个环节, 对各个环节进行实时的监督, 有效保证标本的合格性和安全性。

从第 4 季度不合格标本的产生原因及科室分布来看, 经过 10 月的标本采集培训及标本流程改造, 不合格标本的总数下降, 标本不合格的主要原因发生变化。抗凝标本有凝块仍居于不合格原因榜首。标本溶血由上季度的第 5 上升为第 2, 此为新生儿抽血困难所致, 不合格标本的避免有赖于临床护士采血技术的进一步提高, 尚需较长时间的学习和培训。错用标本容器、条码使用过或条码失效下降为第 4、第 5, 此体现了对护士加强指导和培训的显著效果, 同时, 产科和妇科等主要患者为成人的科室第 4 季度不合格标本的数量显著下降, 标本采集质量得到了显著提高。从第 4 季度分析结果来看, 标本不合格的主要原因在于抗凝标本有凝块和标本溶血, 科室集中在新生儿科和儿科系列。之后, 笔者还将进一步深入上述科室, 了解标本采集的相关细节, 切实解决不合格的主要原因, 持续改进本院的分析前标本质量。

综上所述, 通过对检验科不合格标本的原因及科室分布进行帕累托图分析, 能够及时准确地了解检验科不合格标本的状态, 探讨其主要原因和次要原因, 集中力量解决主要问题。实

践证明, 为保证检验结果的质量, 分析前的标本质量至关重要。加强与临床医护的沟通, 对临床医护采集知识进行相关培训刻不容缓。医院和检验科应该根据实际工作情况, 联合医务科、护理部、科教科, 以岗前培训和继续教育再培训等方式, 加强医护人员的培训, 从源头上保证检验结果质量, 全面提高检验科质量管理水平。

参考文献

[1] 高原, 何柏身, 马国亮. 帕累托图法在疾病构成分析中的应用[J]. *华南国防医学杂志*, 2007, 21(5):56-57.

[2] 黄志基. 实验室内部常见分析前错误及解决方案[J]. *检验医学*, 2010, 25(12):998-1000.

[3] 高铁, 张丹, 李亚东. 某医院城镇职工基本医疗保险患者住院疾病构成的帕累托图分析[J]. *中国卫生统计*, 2011, 28(6):710-711.

[4] 韩润凤, 徐建华. 3 126 张不合理用药处方帕累托图分析[J]. *哈尔滨医药*, 2010, 30(6):33-34.

[5] 陈健峰. 29 957 例出院病人疾病构成的帕累托图分析[J]. *中国卫生统计*, 2013, 30(1):110-111.

[6] 何丽杰. 影响医学检验分析前质量的因素[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(21):1748-1749.

[7] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003:119-138.

(收稿日期:2016-04-07 修回日期:2016-06-13)